

PCT/JP 99/04550

09/763586  
05.10.99

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

JP99/4550

REC'D 22 NOV 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1998年 8月24日

*[Handwritten signature]*

出願番号

Application Number:

平成10年特許願第251812号

出願人

Applicant(s):

明治乳業株式会社  
村松 喬

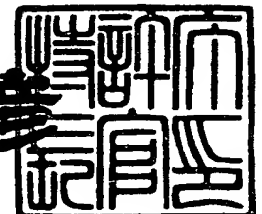
**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年11月 5日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特平11-3075741

【書類名】 特許願

【整理番号】 P980013

【提出日】 平成10年 8月24日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明の名称】 動脈硬化およびP T C A術後の血管再狭窄に対する予防  
・治療剤

【請求項の数】 1

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市天白区中平5-1905 ライオンズマ  
ンション中平101

【氏名】 門松 健治

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市天白区表山1-1602 八事表山住宅  
2-205

【氏名】 堀場 充

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市天白区大字平針字黒石2845-161

【氏名】 村松 喬

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田540番地 明治乳業株式会社細  
胞工学センター内

【氏名】 池松 真也

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田540番地 明治乳業株式会社細  
胞工学センター内

【氏名】 佐久間 貞俊

【特許出願人】

【識別番号】 000006138

【住所又は居所】 東京都中央区京橋2丁目3番6号

【氏名又は名称】 明治乳業株式会社

【代表者】 中山 悠

【特許出願人】

【識別番号】 591038945

【住所又は居所】 愛知県名古屋市天白区大字平針字黒石 2845-161

【氏名又は名称】 村松 喬

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 動脈硬化およびPCTA術後の血管再狭窄に対する予防・治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 MK遺伝子から転写された一本鎖mRNAのセグメントに結合し細胞内のMKタンパク合成を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、血管内膜肥厚に起因する疾患の治療・予防剤に関し、さらに詳しくは、MKまたはその阻害剤を有効成分とする治療・予防剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、動脈硬化、特に冠動脈硬化が原因で起こる狭心症とか心筋梗塞といった、虚血性心疾患の発症頻度が増加の一途を辿っている。動脈硬化の主要な病理組織像は、局所性に生ずる内膜肥厚や弾性の低下である。この結果、循環障害が生じ、心筋組織への栄養不足及び酸素不足をもたらし、上記病態を引き起こす。

【0003】

内膜肥厚の病理発生に関して多数の重要な発見があるが、その代表的なものとして、例えば、肥厚内膜の主な構成細胞は、中膜から遊走してきた平滑筋細胞であることの発見である (Parker, F.: Amer. J. Pathol., 36: 19-53, 1960; Webster, W. S., S. P. Bishop & J. C. Geer: Amer. J. Pathol., 76: 245-264, 1974)。さらに、動脈硬化の進展が、傷害に対する修復反応の結果であるとの説 (Ross, R.: N. Engl. J. Med. 314: 488-500, 1986) は、現在においても動脈硬化の理解の基本となっている。

【0004】

このような内膜肥厚による血管の狭窄部をバルーンで膨らませ、物理的に血管を拡張させる治療法、すなわち、経皮的冠状動脈形成術 (percutaneous transluminal coronary angioplasty; PCTA) が現在盛んに行われ、優れた効果 (症状改善率90%以上) が得られているが、PCTA施行後6カ月以内に、同じ部位で30~60%

の頻度で再狭窄が生じている。これは、動脈壁傷害部位に対する新生内膜の形成という修復機転が過剰に生じた結果であると病理学的に認識されている (Nobuyoshi, M. et al: J. Am. Coll. Cardiol. 17: 433-439, 1991; )。さらに、この新生内膜が、中膜からの血管平滑筋細胞の遊走、増殖、および細胞外マトリックス増生などによることが明らかにされ、この過程で、血管平滑筋細胞は、収縮型から合成型に形質転換し、細胞増殖を促す血小板由来増殖因子 (PDGF)、線維芽細胞増殖因子 (EGF) などの各種増殖因子、インターロイキンや腫瘍壊死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) などのサイトカイン、アンジオテンシンII、トロンビンなどが産生され、対するレセプターも過剰発現するなど、その増殖機転は分子生物学的にも解明されてきている。

【0005】

このようなことから、血管平滑筋細胞の遊走、増殖を抑制することが再狭窄予防の基本とされ、動物実験で多くの薬剤の内膜増殖抑制効果が検討され、有効なものについて臨床試験が実施された。しかし、いずれの薬剤も臨床的に有効性を立証することができなかった (Circulation. 86: 100-110, 1992; Weintraub, W. S. et al.: N. Engl. J. Med. 331: 1331-1337, 1994)。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、血管内膜の新生を調節するための新規な薬剤、特に動脈硬化の治療、PTCA術後の血管再狭窄防止のための新規な薬剤を提供することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、ラットの総頸動脈の内皮傷害モデルの血管組織から調製したmRNAについて、RT-PCR及びCompetitive PCRを実施したところ、傷害後7日から10日にかけて、MK mRNAの発現が増大しており、また、野生型マウス及びMKノックアウトマウスから作製した新生内膜形成モデルにおいて、野生型マウスの新生内膜が、MKノックアウトマウスのそれに比して著明に増大しており、MKノックアウトマウスにMKを注入すると新生内膜が増大することから、血管内膜の肥厚に、MK

が重要な役割を果たしていると考え、細胞におけるMKの発現を阻害することにより、対応する増殖-刺激活性が抑えられ、MKが関与する動脈硬化や、PTCA後の血管再狭窄防止を多少とも解消する考え、本発明を完成した。

#### 【0008】

すなわち、本発明は、MK遺伝子から転写された一本鎖mRNAのセグメントに結合し細胞内のMKタンパク合成を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドに関する。

#### 【0009】

##### 【発明の実施の形態】

ミッドカイン (midkine; MK) は、レチノイン酸による胚性腫瘍細胞の分化誘導過程で、

早期に発現が誘導される遺伝子の産物として発見された (Kadomatsu, K. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 151: 1312-1318, 1988)。プレイオトロフィン (PTN; 別名HB-GAM) は、神経細胞突起伸長能をもつ結合タンパク質として、新生ラットの脳に発見された (Rauvala, H.: EMBO J., 8: 2933-2941, 1989)。MKとPTNは、発生過程における細胞増殖、生存、及び分化を制御するヘパリン結合性のタンパクであり (Tomomura, M. et al.: J. Biol. Chem., 265: 10765-10770; Li, Y. et al.: Science 250: 1690-1694, 1990; Rauvala, H.: EMBO J., 8: 2933-2941, 1989; Wellstein, A. et al.: J. Biol. Chem., 267: 2582-2587, 1992)、およそ50%の相同性を持ち (Tomomura, M. et al.: J. Biol. Chem., 265: 10765-10770; Kuo, M. et al.: J. Biol. Chem., 265: 18749-18752; Tsutsui, J. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 176: 792-797, 1991)、MKファミリーを形成する (Muramatsu, T.: Dev. Growth Differ., 36: 1-8, 1994)。

#### 【0010】

成熟MKタンパク質は、塩基性アミノ酸とシステインに富む、121アミノ酸からなる分子量13000タンパク質で、その機能は多岐にわたり、神経細胞の生存促進、神経突起伸長、血管内皮細胞における線溶系亢進、NIH3T3細胞の形質転換などを挙げることができる。これらに加えて、最近MKの組織再構築への関与が注目されている。すなわち、脳梗塞巣周囲のグリア細胞や、発生途上で上皮-間質間相

相互作用が起こるところの主に上皮側などでMKの発現が観察されている。

#### 【0011】

本発明者らは、ラット頸動脈の内皮傷害モデルの血管組織より、mRNAを調整し、MK、HB-GAM(Heparin-binding Growth-associated Molecule;Pleiotrophin)、Syndecanファミリー(Syndecan-1、Syndecan-3、Syndecan-4)、RPTP- $\beta$ 、及びグリセロアルデヒドリン酸脱水素酵素(GAPDH;ハウスキーピング遺伝子)(内部標準)についてRT-PCRを行い、これらのタンパクの発現を調べてみると、MKについては、7日から14日にかけてmRNA発現が増大していることが認められる(図1a)。この発現パターンと併せて、例えばMKのレセプターのような働きをすると考えられているSyndecanファミリー(血液・腫瘍科、33(5):416-423,1996)のSyndecan-1は、3日目から14日目にmRNAの強い発現が認められる。一方、MKファミリーであるHB-GAMの発現は、7日目頃に一過性に発現が増大している。また、HB-GAMのレセプターと考えられるRPTP- $\beta$ (J.Biol.Chem.271,21446-21452,1996)は、やはりHB-GAMの発現が上昇しピークに達すると考えられる術後3日から7日にかけてmRNAが強く発現していることが認められる。これに対して、内部標準)GAPDHは、術後の日数に関係なく一定の発現を示していることが認められる(図1e)。

#### 【0012】

また、術後のMKの発現量の変化を、Competitive PCRで調べると、GAPDHは、術後14日目まで常に同様の発現量を示していることが認められる( $10^5$  copies/ $\mu$ l)のに対して、MKは術後7日目に発現が10倍増大していることが認められる(図2)。すなわち、MKは、術後7日目にmRNAの発現が最高に達するような発現形式で出現することが示される。3日目、7日目、14日目の各組織をウエスタン・ブロット解析してみると、確かにMKタンパク質が確認され、術後7日目にも多くの量のMKタンパク質が発現することが明らかである(図2)。以上の結果から、MKは、そのファミリーであるHB-GAMとは、mRNAの発現パターンを異にし、MKのみが新生内膜の形成に協調した形で発現してきていると考えられる。

#### 【0013】

内皮傷害後の新生内膜の形成について(実験医学,Vol.14,No.12,79-84,1996,C

irculation.1997;96:4333-4342.)、14日目のラットの血管組織をヘマトキシリン・エオジン染色してみると、内膜が形成されず、外膜の次に中膜がそのまま増大しており、血管平滑筋の増殖が確認される(図4b,c)。これに対し、処置を施していないラットの血管内膜部は、血管が外膜、中膜、内膜ときれいに形成されている(図4a)。さらに、14日目のラットの血管組織における、抗MK抗体(特願平9-205332)による免疫組織化学的染色の結果では、この増殖している血管平滑筋細胞の部分が染色される(図4d)。これらの結果から、増殖している平滑筋細胞にMKが関与していることが明らかである。すなわち、PTCA術後の再狭窄の原因である平滑筋の過剰増殖にMKが関与しており、MKの発現を抑制することでPTCA後の再狭窄の課題が解決出来るのではないかと考えられる。

【0014】

アンチセンス技術は、遺伝子の相補性を利用し、特定の遺伝子の発現を抑制するために、目的の遺伝子とハイブリダイズする核酸配列をもった遺伝子か、人工的に合成した短い核酸(アンチセンスオリゴ)を導入するものであり、それに対し、デコイ型核酸医薬は、特定の転写調節因子の結合部位への結合を阻害し、活性化される遺伝子群の抑制を行うものである。

【0015】

本発明は、MK特異的一本鎖RNAにアニール化し、それによってMKの生成を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用することに基づく。MK合成を阻害すると、相応する増殖-刺激活性が抑えられ、MKが関与する血管内皮肥厚を多少とも解消する。

【0016】

本発明にしたがって、MKをコードするmRNAの部分にハイブリダイズできるように設計されており、それによってこれらのRNAの機能が阻害されるオリゴヌクレオチドが提供される。

【0017】

アンチセンス技術は、この遺伝子産物を阻害する非常に特異的で効力の強い方法を提供する(Stein & Chang, Science 261: 1004-1012, 1993)。アンチセンス

オリゴヌクレオチドは、典型的には短いDNA配列であり、通常その長さは10～50塩基であって、相応する標的mRNAの特異的な領域に相補的である。それらの標的転写物へのアンチセンスオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションは、相補的な塩基対を形成する結果、高い特異性を示す。アンチセンスオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションは、標的部位はオリゴが接近する際に影響を与えることのできる転写物の長さ、化学修飾、及び二次構造のようなパラメーターによって作用される (Stein et al.: Cancer Research 48: 2659, 1988)。

【0018】

与えられたオリゴについて好ましい長さを選択する場合なは、最も好都合な性質が得られるようにバランスをとらなくてはならない。10～15マーのような短いオリゴは、高い細胞侵入性を示す一方、遺伝子特異性が低い。これとは対照的に、20～30塩基の長いオリゴは、良好な特異性を示す一方、細胞への取り込み速度は、小さくなる。mRNA標的配列に接近する能力も重要であり、したがって、標的とされるmRNAに存在するループ形成領域は、見込みのある標的を提供する。

【0019】

本明細書における「オリゴヌクレオチド」という用語は、DNAおよびRNAのデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチド構造のような天然に存在するオリゴマーの核酸部分、ならびに天然に存在する核酸に結合する能力のある人工アナログの両方を包含する。本発明のオリゴヌクレオチドは、ホスホジエステル結合によって、またはメチルホスホネート、ホスホロチオエート、もしくは他の結合により結合したアナログによって、結合したリボヌクレオチドモノマーに基づいていけばよい。またそれらは、基本構造または他の修飾は変化しているが、天然に存在するDNA構造およびRNA構造に結合する能力を保持したままである、モノマー部分を有していてもよい。このようなオリゴヌクレオチドは、当業者に周知の方法、例えば市販の機械およびPerkin-Elmer/Applied Biosystem (Foster City, CA) より入手できる試薬を用いる方法によって調製することができる。

【0020】

ホスホジエステル結合したオリゴヌクレオチドは、血清でまたは細胞内部でヌクレアーゼの作用を特に受けやすく、そのため好適な態様において、本発明のオ

リゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼ抵抗性であることが明らかになっているホスホロチオエート結合またはメチロホスホネート結合したアナログである (Stein et al.: Cancer Research 48: 2659, 1988)。

#### 【0021】

本発明の他の態様において、このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、発現構築物を用いて標的細胞を感染させることによって生成されるRNA分子である。このように作られるRNA分子は、mRNAにハイブリダイズすることにより、そのmRNAの翻訳を阻害し、そして、MKの合成を阻害するように選択される。

#### 【0022】

mRNA標的物を用いてこのオリゴをハイブリダイズすると、相応する遺伝子産物の発現を多重機構で阻害することができる。「翻訳停止」状態では、標的mRNAとオリゴの相互作用によってリボソーム複合体の作用が抑えられ、それによりmRNAのタンパク質への翻訳が阻止される (Hauptle et al.: Nucl. Acids. Res. 14: 1427, 1986)。ホスホジエステルDNAまたはホスホロチオエートDNAオリゴの場合では、標的となるRNA配列がそのDNAオリゴマーにハイブリダイズするとすぐに、細胞内RNase Hがその標的RNA配列を消化することができる (Walder & Walder, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 5011, 1988)。「翻訳停止」状態におけるさらなる作用機構としては、ある種のオリゴヌクレオチドは、目的の遺伝子を含む二本鎖の標準的なゲノムDNAとともに「トリプレックス」すなわち三重らせん構造を形成することが可能で、それによってRNAポリメラーゼによる転写が妨げられることが明らかである (Giovannangeli et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 10013, 1993)。

#### 【0023】

一つの好ましい態様において、MKオリゴヌクレオチドは、標準的な方法論にしたがって合成される。ホスホロチオエート修飾が施されたDNAオリゴヌクレオチドは、一般的には、さまざまな製造元より入手できる自動化合成装置を用いて合成される。これらの装置は、100ヌクレオチド程度の長さのオリゴヌクレオチドをナノモル単位で合成することができる。

#### 【0024】

また、アンチセンスRNAの形態でのMKオリゴヌクレオチドを、適当な細胞内で標準的なDNA発現ベクターから一時的に発現させることができる。MK DNA配列は、標準的なプラスミドから発現ベクターへとクローニングすることができ、その発現ベクターは、内在するオリゴヌクレオチドをより高いレベルで、または、より効果的に発現できるような特性を備えている。最低限、これらの構築物は、挿入されたDNA配列の転写を開始させる原核のプロモーター配列、または真核のプロモーター配列を必要とする。好ましい発現ベクターは、発現を高レベルにまで誘導することができるものである。これは、適当な宿主細胞において、下流の配列の転写を増加させるような調節領域を付加することによって成し遂げられる。

## 【0025】

例えば、MKアンチセンスオリゴ発現ベクターは、プラスミドpHIL301-MKの一本鎖cDNAから得られる適切な断片を増幅させるPCRを利用して構築することができる。

## 【0026】

PCR反応を行う際に好適なオリゴヌクレオチドプライマーのヌクレオチド配列は当業者であれば適切な配列をMKのcDNA配列から設定することができる。オリゴヌクレオチドの合成法および精製法は、公知である。PCR産物は、プラスミドにサブクローニングされる。これに関連して「クローニングベクター」は、プラスミド、コスミド、または、バクテリオファージのようなDNA分子であり、それは、原核生物の宿主内で自立複製できる。クローニングベクターは、一般的に、そのクローニングベクターを用いて形質転換された細胞の同定および選択に用いるのに好適なマーカー遺伝子だけでなく、そのベクターの必須の生物機能を失わずに、外来のDNA配列が検出可能な状態で挿入され得る制限エンドヌクレアーゼ認識部位を一個所または少数個所含んでいる。マーカー遺伝子は、テトラサイクリン耐性またはアンピシリン耐性の遺伝子を含む。クローニングされたアンチセンス断片は、適当な細菌細胞をクローニングベクターを用いて形質転換し、適切な抗生物質の存在下でその細菌の宿主細胞を増殖させることによって増幅される。続いて、細菌の宿主細胞に対してPCR法を行い、MKアンチセンス配向クローンについてスクリーニングする。

## 【0027】

クローニングしたアンチセンス断片は、クローニングベクターより開裂され、そして発現ベクターに挿入される。好適な発現ベクターには、一般的に、(1) 細菌宿主の複製開始点および抗生物質耐性マーカーをコードする原核細胞のDNA因子、(2) プロモーターのような転写の開始を調節する因子、および(3) 転写の終結/ポリアデニル化配列のような転写工程を調節するDNA因子が含まれる。哺乳動物の宿主では、転写調節および翻訳調節シグナルは、好ましくは、例えば、アデノウイルス、ウシのパピローマウイルス、または類似のウイルスなどのウイルス源由来である。これらのウイルスにおいて、調節シグナルは、高レベルの発現をもたらす特定の遺伝子に關与している。好適な転写調節配列および翻訳調節配列はまた、例えばアクチン、コラーゲン、ミオシン、およびメタロチオニン遺伝子といった、哺乳動物の遺伝子から得ることもできる。転写調節配列は、RNA合成をうまく開始させることのできるプロモーター領域を含んでいる。好適な真核細胞のプロモーターには、マウスメタロチオニン1遺伝子のプロモーター、ヘルペスウイルスのTKプロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、およびサイトメガロウイルスプロモーターが含まれる。

## 【0028】

また、バクレリオファージT3 RNAポリメラーゼプロモーターのような原核細胞のプロモーターは、その原核細胞のプロモーターが真核細胞のプロモーターによって調節されるのであれば、融合遺伝子発現を調節する際に用いることができる。

## 【0029】

哺乳動物細胞における発現に好適なベクターは、哺乳類のエンハンサープロモーター配列から高レベルの構成性の転写を提供するベクターである。クローニングされたMKアンチセンスベクターは、細菌宿主細胞内で増幅され、細胞から単離され、前述のようにして解析される。アンチセンス配列を利用するためのもう一つの可能な方法は、遺伝子治療によるものである。通常レトロウイルス由来であるウイルス様ベクターは、腫瘍細胞内のアンチセンス構築物の取り込みおよび発現のための担体として有用であることが示されるであろう。一般的に、該ベクタ

ーは、インビボで非複製性であり、目的としない非標的細胞の感染を妨げる。このような場合、欠如している複製能をインビトロで与え、それによりアンチセンスベクターを増幅させ包み込むことができるヘルパー細胞系が供給される。非腫瘍細胞の不慮の感染に対するもう一つの予防措置には、腫瘍細胞特異的な調節配列の使用がふくまれる。該配列の調節下では、アンチセンス構築物は、正常組織において発現しない。二つの以前Mの研究により、ヘパリン結合増殖因子の発現を阻害するためにアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用する可能性が検討された。コウハラらは、マウス乳癌細胞のアンドロゲン依存性増殖が、アンドロゲン誘導性のヘパリン結合増殖因子の誘導により仲介されることを示した。

## 【0030】

本発明によるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、MK cDNAのオープンリーディングフレームのいかなる部分に由来するものであってもよい。好ましくは、（1）翻訳開始部位の周辺にあり、（2）ループ構造を形成する、mRNA配列が標的とされる。ヒトゲノムのサイズに基づく、統計解析により、およそ14-15塩基対の長さのDNAセグメントがゲノム内に特有の配列を有していることが示された。したがって、MK RNAの標的化の特異性を確実にするために、アンチセンスオリゴヌクレオチドは少なくとも14ヌクレオチドの長さであり、好ましくは15ヌクレオチドの長さである。したがって、本発明により企画されるオリゴヌクレオチドには、MKのcDNA配列の1-14位、1-15位、1-16位、1-17位、1-18位、1-19位、2-16位、3-17位などに相当するヌクレオチドが含まれる。

## 【0031】

全てのアンチセンスオリゴがMK標的に対して、十分な程度の阻害または十分なレベルの特異性を示すとは限らない。したがって、適当なアンチセンス特性を有するオリゴヌクレオチドを決定するためのスクリーニングを行う必要がある。MK合成の阻害についてオリゴをスクリーニングすることができるいくつかの方法がある。例えば、MKの合成が盛んな数多くの細胞系が存在する。これらに細胞により産生されるMKのレベルは、例えば、放射免疫沈降、ウェスタンブロット、RIA、またはELISAにより測定することができる。MK産生細胞を有効なアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理することにより、MKレベルの減少が引き起こされる

## 【0032】

また、MK活性を直接、解析することが可能である。前述のように、MKのレベルが上昇した細胞系が利用可能である。これらの細胞は、また、軟寒天内コロニー形成のようなある異常な挙動により特徴づけられる。特に内皮細胞の増殖の増加を測定することができ、これはインビボの血管形成のための有用なインビトロモデルである。このような細胞を有効なアンチセンスオリゴで処理することにより、細胞の挙動の変化が生じ、有用なオリゴを同定するために役立つ。前述のようなアッセイは、体内の腫瘍増殖のための標準的なモデルとして有用である。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、動物モデル系でインビボの効率および安全性を試験することができる。

## 【0033】

本発明は、また、MKに対する中和抗体をも用いることができる。本発明で使用される抗MKファミリー抗体は、公知の手段を用いて、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗MKファミリー抗体として、モノクローナル抗体が好ましい。モノクローナル抗体は、公知の方法に準じて作製することができる。例えばヒトMKのcDNAはクローニングされ、そのDNA配列とそれにコードされるアミノ酸配列が報告されている。モノクローナル抗体は、MKタンパク抗原全体に対しても、或いはその一部に対しても作製することができる。特に好ましいのは、可溶性型のヒトMKタンパク抗原に対して作製された抗体である。また、本発明においては、抗原結合断片、例えば、 $F(ab')_2$ やFab断片を含む。

## 【0034】

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、基本的には、ケーラーとミルスタインの方法 (Kohler, G. & C. Milstein, Nature 256: 495-497, 1975) に準じて、以下のようにして作製できる。すなわち、MKタンパクを感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナル抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

【0035】

例えば、抗体取得の感作抗原として使用されるMKタンパクは、ヒトMKについては、特開平9-95454に記載のMK遺伝子/アミノ酸配列を用いることによって得られる。

【0036】

MKは、本発明で使用される抗MK抗体取得のための抗原として使用される限りそのアミノ酸残基数を問わない。MK遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または培養上清中から目的のMKタンパクを公知の方法で精製し、この精製MKタンパクを感作抗原として用いればよい。感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的には、齧歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。

【0037】

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBSや生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後哺乳動物に4～21日毎に数回投与する。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。このようにして免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後、哺乳動物から免疫細胞を取り出し細胞融合に付すが、好ましい免疫細胞として、特に脾細胞が挙げられる。

【0038】

上記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞としては、公知の各々の細胞株、例えばP3 (P3x63Ag8.653) (Kearny, J. F. et al.: J. Immunol., 123: 1548-1550, 1979)、P3x63Ag8U.1 (Yelton, D. E. et al.: Current Topics in Microbiology 81: 1-7, 1978)、NS-1 (Kohler, G. & Milstein, C.: Eur. J. Immunol., 6: 511-519, 1976)、MPC-11 (Margulies, D

. H. et al.: Cell, 8: 405-415, 1976)、SP2/0 (Shulman, M. et al.: Nature, 276: 269-270, 1978)、F0 (de St. Groth, S. F. & Scheidegger, D.: J. Immunol. Methods, 35: 1-21, 1980)、S194 (Trowbridge, I. S.: J. Exp. Med., 148: 313-323, 1978)、R210 (Galfre, G. et al.: Nature, 277: 131-133, 1979)、等が好適である。

#### 【0039】

上記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は、基本的には、公知の方法、例えば、ミルステインらの方法 (Galfre, G. & Milstein, C., Methods Enzymol. 73: 3-46, 1981) 等に準じて行うことができる。具体的には、前記細胞融合は、例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG)、センダイウイルス等が使用され、さらに、融合効率を高めるため、ジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することができる。

#### 【0040】

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して、免疫細胞を1～10倍とするのが好ましい。細胞融合に用いる培養液としては、例えば、ミエローマ細胞株に好適なRPMI 1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。

#### 【0041】

細胞融合は、免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を上記培養液中でよく混合し、予め37℃程度に加温したPEG溶液、例えば、平均分子量1000～6000程度のPEG溶液を、通常、30～60%(w/v)の濃度で添加し、混合することによって目的の融合細胞 (ハイブリドーマ) が形成される。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して、上清を除去する操作を繰り返すことにより、ハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去できる。

#### 【0042】

当該ハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えば、HAT培養液で培養することにより選択される。当該HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以

外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。次いで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニング及び単クローニングが行われる。

【0043】

また、本発明では、組換え型抗体や改変抗体が使用できる。組換え型抗体としては、例えば、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んでこれを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を用いることができる（例えば、Borrebæk, C. A. K. & Larrick, J. W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990）。改変抗体としては、例えば、キメラ抗体、ヒト型化抗体が使用できる。キメラ抗体は、ヒト抗体以外の抗体V領域をコードするDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し、産生させることにより得られる（EP 125023, PCT W096/02576）。

本発明で使用される抗体は、MKに結合しMKの活性を阻害するかぎり、抗体の断片や修飾物であってもよい。例えば、抗体の断片として、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、FvまたはH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv)が挙げられる。

【0044】

【実施例】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。

【0045】

【実施例1】 実験的再狭窄モデルにおける内膜新生とMK発現との関連

ラット頸動脈の内皮傷害モデルを用いて、内膜新生とMK発現との関連を、1) PCR、2) ウェスタン・ブロット、及び3) 組織の解析、により調べた。

【0046】

15～20週令の雄性ウイスターラット（体重：350～400 g）は、腹腔内にネンブタール50mg/kgを投与して麻酔し、頸部の正中線を切開し外頸動脈を露出させた

。外頸動脈の遠位部は結紮し、近位部に糸をかけた状態で、切開部から、フォガティーの動脈塞栓切除用カテーテル（2フレンチ）を挿入し、総頸動脈を下行させて、大動脈弓のレベルに到達させた。生理食塩水にて少し抵抗があるくらいにバルーンを膨らませ、回転させながらゆっくりと挿入部まで引き戻してバルーンを収縮させた。この操作をさらに2回繰り返した。カテーテルを取り除き、外頸動脈を結紮して内頸動脈を通る血流は正常に維持した。切開部を縫合して、ラットは麻酔から回復した後、個別のケージに戻した。

【0047】

1) PCRによるMK発現の検出

対照群として正常ラット3匹、再狭窄モデル作製後、3時間、3日、7日、及び14日経過の各モデルに対して各3匹、計15匹を用いた。

【0048】

(a) RT-PCRによる血管組織の各タンパク質mRNAの検出

対照群、再狭窄モデル作製後、3時間、3日、7日、及び14日経過における血管組織のMK、PTN、Syndecan-1、Syndecan-3、Syndecan-4、RPTP- $\beta$ 、及びGAPDH（内部標準）のmRNA発現量を、RT-PCRにより検出した。各組織よりmRNAを調製し、これを出発材料としてRT-PCRを行った。プライマーは、既知の部分の最適と考えられる部分を選び設定した（クボウ株式会社）。すなわち、MKにおいては、センスプライマー5'-gCCggATCCATgCAGCACCGAggCTTCTTC-3' (30mer)（配列番号：1）、アンチセンスプライマー5'-ACTAgCATAATCaggaACATCATAgTCCTTTCCTTTTCCTTT-3' (42mer)（配列番号：2）、PTNにおいては、センスプライマー5'-ACTggTgCCgAgTgCAAACAA-3' (21mer)（配列番号：3）、アンチセンスプライマー5'-gAgTTTgCCACAgggCTTggA-3' (21mer)（配列番号：4）、Syndecan-1においては、センスプライマー5'-ggAggCACTTCTgTCATCAA-3' (20mer)（配列番号：5）、アンチセンスプライマー5'-AgCACTTCCTTCCTgTCCAA-3' (20mer)（配列番号：6）、Syndecan-3においては、センスプライマー5'-gATgAgCCAgAggTgCCAgT-3' (20mer)（配列番号：7）、アンチセンスプライマー5'-gCCACCTACgATCACAgCTA-3' (20mer)（配列番号：8）、Syndecan-4(Ryudocan)においては、センスプライマー5'-gAAgACgCTgggggCCTTgAg-3' (21mer)（配列番号：9）、アンチセンスプライマー5'-TCTgAg

gggACACggATgCCA-3' (21mer) (配列番号: 10)、RPTP- $\beta$ においては、センスプライマー5'-ATCggATCCCCgTTCTCAACACATCCCTgAAT-3' (32mer) (配列番号: 11)、アンチセンスプライマー5'-CgTCTCgAgCTAAGCATCTggAgAAAAATgTCTC-3' (33mer) (配列番号: 12)、及び、GAPDHにおいては、センスプライマー5'-gACCACAgTCCATgCCATCAC-3' (21mer) (配列番号: 13)、アンチセンスプライマー5'-gTAGCCgTATTCAATTgTCATACC-3' (23mer) (配列番号: 14)を設定した。PCR反応は、熱変性: 94℃30秒 (1サイクル目は1分)、アニーリング: 55℃30秒、伸長反応: 72℃30秒をMKの場合28サイクル、PTNの場合35サイクル、Syndecan-1,3及び4の場合33サイクル、RPTP- $\beta$ の場合35サイクル、GAPDHの場合上記全ての条件のサイクル、を繰り返した。以上のRT-PCRの結果を図1の(a)~(e)に示す。

【0049】

(b) competitive PCR (競合的PCR)によるMK mRNAの定量

対照群、再狭窄モデル作製後、3時間、3日、7日、及び14日経過における血管組織のMK及びGAPDHのmRNAの発現量を、競合的PCR法によって定量的に調べた (図2のa及びb)。target及びcompetitorのバンドの濃さは目視で判定した。すべて上、下(targetとcompetitor)2つのバンドがほぼ同じ濃さのものが、それぞれ中央に来るように並べた。MKについては、対照群(C)でcompetitorのコピー数が $10^7$ でtargetと同じであったのが、3時間後では $10^6$ と同じとむしろ減少するが、7日後には $10^8$ と同じとなり増加している。すなわち、MKでは7日後にはコントロールの約10倍量のmRNAが発現していることが認められた。これに対し、GAPDHでは、対照群(C)、3時間後、3日後、7日後、14日後の全てにおいて $10^5$ と同量であり、解析に使用した各サンプル間の全RNA量にばらつきがないことが認められた。

【0050】

(2) ウェスタンブロット解析

対照群として正常ラット3匹、再狭窄モデル作製後、3日、7日、及び14日経過の各モデルに対して各3匹を用いた。血管組織でのMKタンパク発現量をウェスタンブロット法により解析した (図3)。図3から、再狭窄モデル作製後3時間経過においては、MKタンパク発現量は、対照群と差が認められないが、7日経

過においては、MK発現量は最大となり、14日経過においては、発現量は減少しているものの、なお、対照群に比較してMKタンパク発現量の増加が認められる。

【0051】

(3) 組織の解析

対照群として正常ラット3匹、再狭窄モデル作製後、3日経過に3匹、7日経過に4匹、及び14日経過に3匹用いた。

【0052】

(a) ヘマトキシリン・エオジン染色

4%パラホルムアルデヒド(和光純薬工業株式会社)固定液を用いて血管組織切片を作製した。全自動包埋機を使用してパラフィン包埋後、5 $\mu$ m切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色(以下、H.E染色と称する)した(図4a~c)。aは対照群の14日経過におけるH.E図を、bは再狭窄モデル作製後14日経過におけるH.E図を、cはaの拡大図を、それぞれ示す。図から明らかなように、対照群においては、内膜の顕著な肥厚が認められるのに対し、再狭窄モデル作製後14日経過したモデルにおいては、肥厚が全く認められない。

【0053】

(b) 免疫組織化学

再狭窄モデル作製後14日経過における血管組織切片を、抗MKポリクローナル抗体、及び2次抗体として抗ウサギIgG抗体(Jackson laboratory)を用いて免疫組織化学染色した(図5)。図から明らかなように、新生内膜部分に著明なMKタンパク質の発現が認められる。

【0054】

[実施例2] MKノックアウトマウスにおける血管内膜の新生

10~12週令の雄性129/Sv系マウスのMK遺伝子のエクソン2の一部と3の一部を破壊したMKノックアウトマウス(25~30g)(Homo)(生化学7、平成8年・第68巻、pp.1239, 4-P-1244)を用いた。各実験に用いたマウスの数は、野生型マウス10匹、MKノックアウトマウス10匹、MKノックアウトマウス(生理食塩水注入ポンプ植え込み)10匹、MKノックアウトマウス(MK注入ポンプ植え込み)10匹であった。モデルの作製には、まず、ネブタール50mg/kgをマウスの

腹腔内に投与し、麻酔をかけた。マウスの頭部を伸展させ四肢を固定した。マウスの場合は、一般に、実施例1のラットの場合と異なり、総頸動脈分岐部を結紮するのみ。マウスは相対的に血圧が高いためと推察されるが、血栓による完全閉塞は起こりにくく、圧負荷による刺激のため新生内膜が形成される (Arterioscler Thromb Vasc Biol.1997;17:2238-2244)。この新生内膜形成モデルを作製 (各群10匹ずつ) し、新生内膜を病理学的に解析したところ野生型マウスの新生内膜がMKノックアウトマウスの新生内膜に比べ、著明に増大していることがわかった (データ示さず)。そこで、実施例1の結果とも考え併せ、MKが新生内膜形成に関与しているのではと考え、新たにMKノックアウトマウスについて新生内膜形成モデル作製 (各群10匹ずつ) 後、MK0.8mg/mLを100  $\mu$ L注入したポンプ (Micro-Osmotic Pump<sup>®</sup>alet-MODEL 10070:alza;0.5  $\mu$ L/hr.で7日間有効) とコントロールとして生理食塩水を注入したポンプをマウス腹部皮下に植え込み、7日で交換、14日目まで続行した後、殺して解析した。MKは、特開平9-95454の実施例に記載の方法で得たMKを用いた。

## 【0055】

血管の標本の作製には、マウスを灌流固定する際に、PBS(-)に4%になるように溶解したパラホルムアルデヒド (和光純薬工業株式会社) 固定液を使用した。全自動包埋機を使用してパラフィン包埋後、5  $\mu$ m切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色した。写真は示していないが、結果は、生理食塩水をポンプで注入した群での血管内膜の新生より、MKをポンプで注入した群での血管内膜新生の方が有意に増大していた。野生型でエンドジェニアスなMKが血管内膜の新生に効いていたことが、MKを作ることの出来ないノックアウトマウスに外部よりMKを入れてやったことにより得られたデータ (つまり、生理食塩水では、新生内膜は形成は弱い、MKを加えてやると新生内膜がより過剰に形成されてくる) で証明されたと考えられる。このことより、血管内膜の新生にMKが重要な役割を果たしていることが示唆された。 【0056】

以上、実施例1及び2より、MKは血管拡張術後再狭窄に関与する重要な分子であることが示唆された。

## 【0057】

【発明の効果】

本発明により、MKに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド或いは抗MK抗体が、動脈硬化およびPCTA術後の血管再狭窄に対する予防・治療剤として明らかにされた。

【0058】

【図面の簡単な説明】

【図1】

ラットの実験的再狭窄モデルの血管組織におけるmRNAの経時的な発現をRT-PCRにより検出した図である。

(a)はMKの、(b)はPleiotrophin(PTN)の、(c)は、Syndecan-1、Syndecan-3、及びSyndecan-4の、(d)はRPTP- $\beta$ の、(e)はGAPDHのそれぞれについてのmRNAの経時的な発現を示す。

【図2】

ラットの実験的再狭窄モデルの血管組織におけるmRNAの経時的な発現を競合的PCR法により定量的に検出した図である。GAPDHは内部標準として利用した。

【図3】

ラットの実験的再狭窄モデルの血管組織における経時的なMKタンパク質発現量をウエスタン・ブロット法によって解析した図である。

【図4】

a～cは、ラットの実験的再狭窄モデル作製後14日経過における血管組織のヘマトキシリン・エオジン染色パラフィン切片を示し、aは対照群の14日経過におけるH.E図を、bは再狭窄モデル作製後14日経過におけるH.E図を、cはaの拡大図を、それぞれ示す。

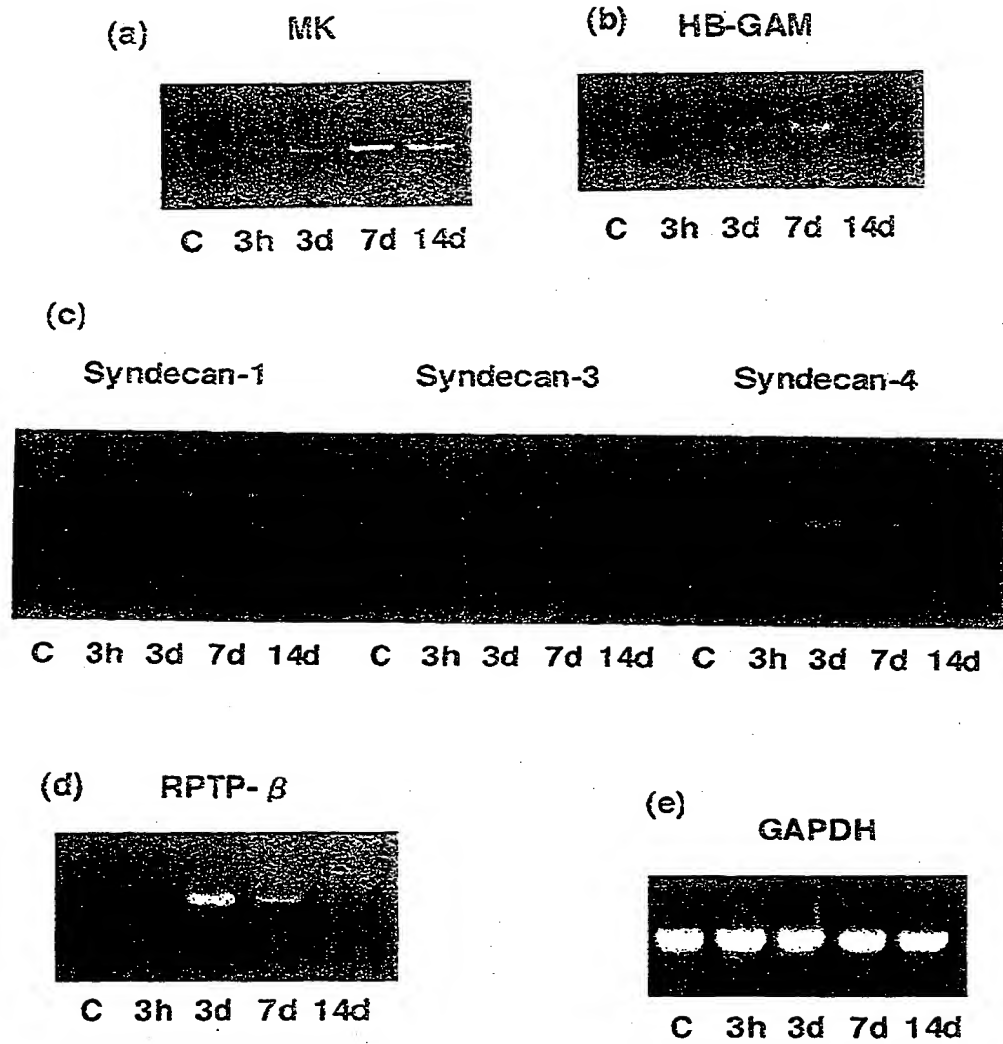
【図5】

ラットの実験的再狭窄モデル作製後14日経過における血管組織の血管組織のパラフィン切片を、抗MKポリクローナル抗体、及び2次抗体として抗ウサギIgG抗体(Jackson laboratory)を用いて免疫組織化学染色した図を示す。

【書類名】

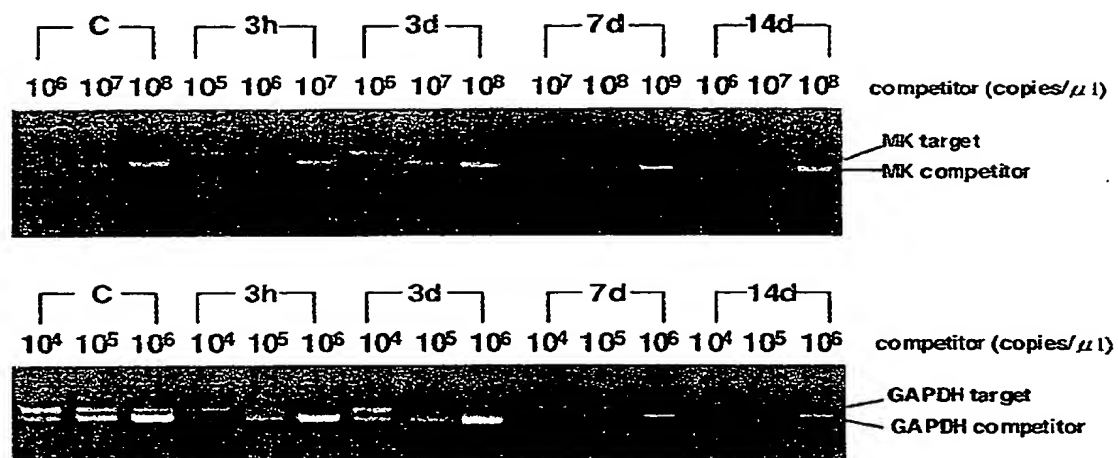
図面

【図1】



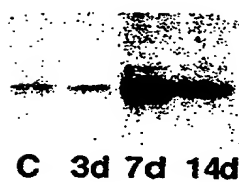
【図 2】

Competitive PCR



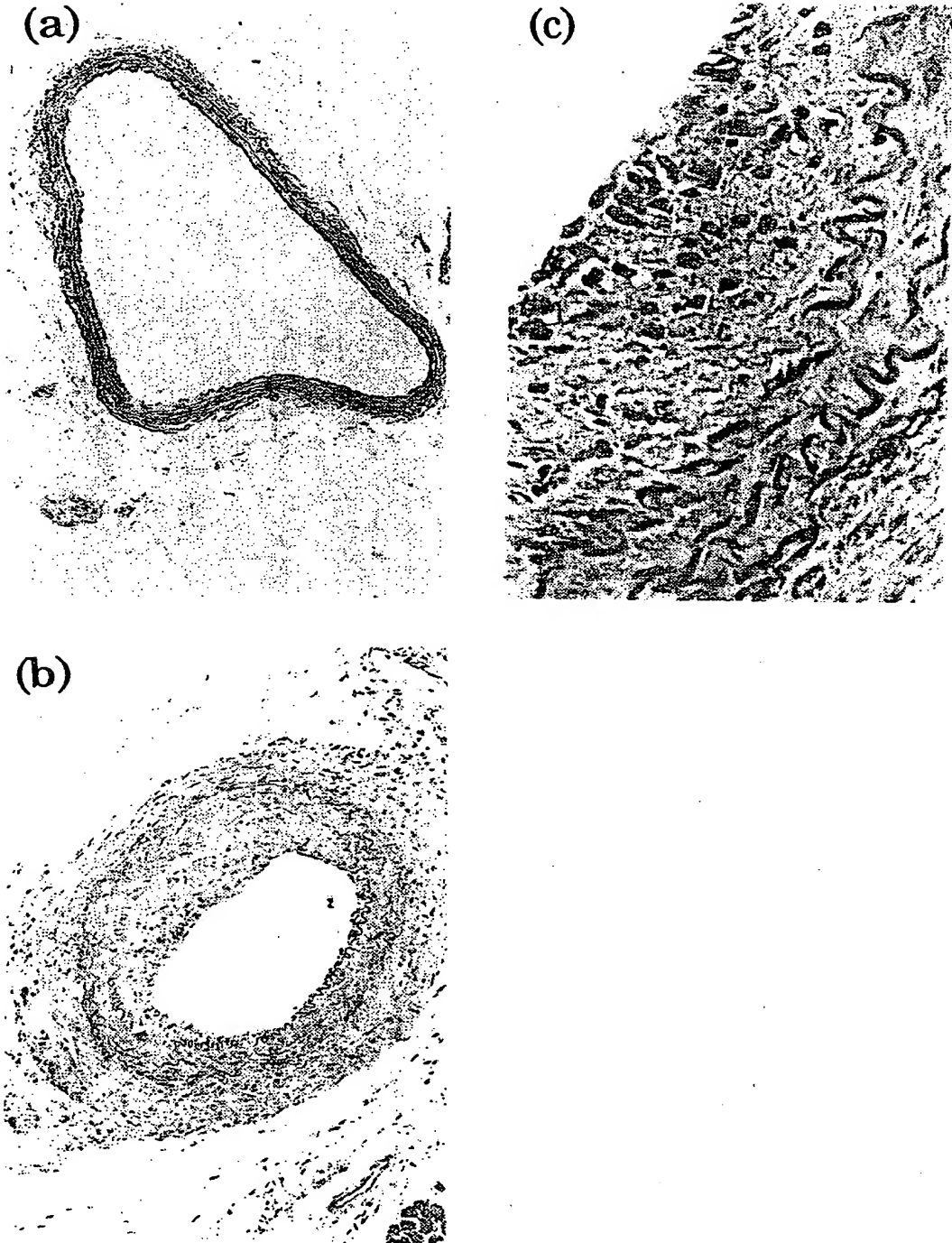
【図 3】

Western blot



【图 4】

図面代用写真



【図5】

図面代用写真



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

血管内膜の新生を調節するための新規な薬剤、特に動脈硬化の治療、PTCA術後の血管再狭窄防止のための新規な薬剤を提供することを課題とする。

【解決手段】

MK遺伝子から転写された一本鎖mRNAのセグメントに結合し細胞内のMKタンパク合成を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【選択図】 なし

【書類名】  
【訂正書類】

職権訂正データ  
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

申請人

【識別番号】

000006138

【住所又は居所】

東京都中央区京橋2丁目3番6号

【氏名又は名称】

明治乳業株式会社

【特許出願人】

申請人

【識別番号】

591038945

【住所又は居所】

愛知県名古屋市天白区天白町大字平針字黒石284  
5-161

【氏名又は名称】

村松 喬

【書類名】 手続補正書  
【提出日】 平成10年11月25日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【事件の表示】  
【出願番号】 平成10年特許願第251812号

【補正をする者】  
【事件との関係】 特許出願人  
【識別番号】 000006138  
【住所又は居所】 東京都中央区京橋2丁目3番6号  
【氏名又は名称】 明治乳業株式会社  
【代表者】 中山 悠  
【発送番号】 024987

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願  
【補正対象項目名】 特許出願人  
【補正方法】 変更

【補正の内容】

【特許出願人】  
【識別番号】 000006138  
【住所又は居所】 東京都中央区京橋2丁目3番6号  
【氏名又は名称】 明治乳業株式会社  
【代表者】 中山 悠

【特許出願人】  
【識別番号】 591038945  
【住所又は居所】 愛知県名古屋市天白区天白町大字平針字黒石2845-161  
【氏名又は名称】 村松 喬

【書類名】  
【訂正書類】

職権訂正データ  
手続補正書

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】

申請人

【識別番号】

000006138

【住所又は居所】

東京都中央区京橋2丁目3番6号

【氏名又は名称】

明治乳業株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006138]

1. 変更年月日 1990年 8月14日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都中央区京橋2丁目3番6号  
氏 名 明治乳業株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [591038945]

1. 変更年月日 1996年 9月26日

[変更理由] 住所変更

住 所 愛知県名古屋市天白区天白町大字平針字黒石2845-161

氏 名 村松 喬